

УДК 618.15: 612.62: 612.015.1

© С.В. Литвинова, Е.П. Коваленко, А.В. Кубышкин, 2012.

## **ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРОТЕИНАЗ И ИХ ИНГИБИТОРОВ ЦЕРВИКОВАГИНАЛЬНЫХ СМЫВОВ У ЖЕНЩИН С РАЗЛИЧНОЙ ХАРАКТЕРИСТИКОЙ БИОЦЕНОЗА ВЛАГАЛИЩА**

**С.В. Литвинова, Е.П. Коваленко, А.В. Кубышкин***Кафедра патологической физиологии (зав. кафедрой - профессор А.В. Кубышкин),**ГУ «Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского, г. Симферополь».*

### **STATE OF THE NONSPECIFIC PROTEOLYTIC ENZYMES AND THEIR INHIBITORS IN CERVICOVAGINAL WASHOUT FLUID IN DIFFERENT VARIANTS OF VAGINAL BIOCECENOSIS**

**S. V. Litvinova, Ye. P. Kovalenko, A. V. Kubyshkin****SUMMARY**

Proteinase-inhibitor activity in cervicovaginal washout fluid of women with different variants of vaginal changes of biocenosis, leukocytic reaction and level of microbial contamination it was studied. It was showed that disorders of vagina biocenosis have accompanied by imbalance of local nonspecific proteinases and their inhibitors. Imbalance appeared as increase of elastase- and trypsin-like proteinase activity and decrease of acid-stable inhibitors. The most expressed imbalance development in vaginitis. Investigation of proteinases and their inhibitors can use for diagnostics of acute or chronic diseases of women's reproductive system.

### **ОСОБЛИВОСТІ СТАНУ НЕСПЕЦИФІЧНИХ ПРОТЕЇНАЗ І ЇХ ІНГІБІТОРІВ ЦЕРВИКОВАГІНАЛЬНИХ ЗМИВІВ У ЖІНОК З РІЗНОЮ ХАРАКТЕРИСТИКОЮ БІОЦЕНОЗУ ПІХВИ**

**С. В. Литвинова, Є. П. Коваленко, А. В. Кубишкін****РЕЗЮМЕ**

У статті представлені результати досліджень активності неспецифічних протеїназ і їх інгібіторів в цервіковагінальних змивах у жінок залежно від мікроскопічної характеристики складу вагінального виділення – біоценозу піхви, лейкоцитарної реакції, ступеню мікробної обсемененості. Встановлено, що порушення біоценозу піхви супроводжується розвитком дисбалансу в стані місцевих неспецифічних протеїназ і їх інгібіторів, який проявляється зростанням трипсину- і еластазоподібних протеїназ і зниженням рівня місцевосинтезуемих кислотостабільних інгібіторів протеїназ. Найбільш виражений дисбаланс відмічений при розвитку вагінітів. Оцінка змін в стані компонентів протеїназ-інгібіторної системи цервіковагінальних змивів може використовуватися для діагностики гострих і хронічних захворювань жіночої репродуктивної системи.

**Ключевые слова:** воспаление, протеиназы, ингибиторы протеиназ, биоценоз влагалища, репродуктивная функция женщин.

Воспалительные заболевания женских половых органов занимают ведущее место в структуре гинекологических заболеваний, составляя 60-65% общей патологии. Одно из важных свойств данных заболеваний – это формирование многочисленных нарушений репродуктивной функции женщин. При этом увеличивается риск развития таких осложнений, как бесплодие, невынашивание беременности, преждевременное излитие околоплодных вод, преждевременные роды [6,10,16]. Считается, что одним из основных пусковых механизмов в развитии воспаления женской половой сферы является микробная инвазия. Причем даже, микроорганизмы, составляющие нормальную микрофлору влагалища, могут при определенных условиях стать вирулентными и участвовать в развитии воспаления [9,11,15].

Формирование воспалительного процесса, с одной стороны, приводит к активации лейкоцитов, высвобождающих медиаторы воспаления, включая большую группу протеиназ [1,8]. Среди них, особое зна-

чение в формировании деструктивного потенциала придается лейкоцитарной эластазе, способной разрушать кроме эластина, целый спектр различных белков, тем самым, нарушая процессы защиты и адаптации [12,13,14,]. С другой стороны, повреждение слизистой при воспалении может приводить к нарушению синтеза и секреции ингибиторов, тем самым способствуя развитию патологических состояний, приводящих к нарушению функции репродуктивной системы женщин.

Целью работы явилось изучение состояния протеиназ-ингибиторной системы цервикагинальных смывов у женщин с различной характеристикой биоценоза влагалища.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В исследование были включены 40 женщин репродуктивного возраста, проходивших профилактический осмотр или лечение в РКБ им. Н.А.Семашко г. Симферополя. Для разносторонней оценки характера изменений в протеиназ-ингибиторной системе

цервикагинального секрета предпринято несколько вариантов формирования групп обследованных пациенток, в основу которых положено микроскопическое исследование отделяемого влагалища женщин [2,4]. Первый вариант основан на количественной оценке микробной обсемененности вагинального отделяемого по числу микробных клеток и качественной характеристике микрофлоры. В результате были сформированы группы: с низким содержанием микроорганизмов и абсолютным преобладанием лактобацилл (n=14), с умеренным количеством микроорганизмов и сниженным титром лактобацилл (n=15) и с большим количеством микроорганизмов и резко сниженным количеством лактобацилл (n=11).

При втором варианте распределения пациенток на группы учитывалась выраженность воспалительных изменений по степени лейкоцитарной реакции (ЛР), что позволило распределить обследуемых женщин на следующие группы: со слабой лейкоцитарной реакцией - до 5-10 лейкоцитов в поле зрения (n=12), умеренно выраженной лейкоцитарной реакцией – не более 10-20 лейкоцитов в поле зрения (n=14), выраженной лейкоцитарной реакцией - более 20 лейкоцитов в поле зрения (n=14).

Третий вариант формирования групп включал интегральную оценку состояния биоценоза влагалища с использованием принципа классификации Е.Ф. Кира [4]. При данном варианте формирования групп 11 женщин вошло в группу с нормоценозом, 16 женщин - в группу с промежуточным типом биоценоза и 13 пациенток - в группу неспецифических вагинитов.

Цервикагинальный смыв получали в 1 фазу менструального цикла, путем интравагинального введения 10 мл физиологического раствора с после-

дующей аспирацией. Полученный аспират центрифугировали при 5000g. Надосадочную жидкость использовали для проведения биохимических исследований. Определение компонентов протеиназ - ингибиторной системы в цервикагинальных смывах проводили с использованием энзиматических методов [7]. Трипсиноподобную активность (ТПА) определяли по скорости расщепления N- $\alpha$ -бензоил-L-аргинина - этилового эфира (БАЭЭ). Об эластазоподобной активности (ЭПА) в биологической жидкости судили по гидролизу синтетического субстрата N-т-бок-аланил-п-нитрофинилового эфира (БАНФЭ). Определение антитриптической активности (АТА) проводили по методу, основанному на торможении расщепления трипсином БАЭЭ. Для определения кислотостабильных ингибиторов в цервикагинальных смывах пробы вначале обрабатывали для осаждения кислотостабильных белков и выделения КСИ из комплекса с протеиназами. В последующем, исследование проводили на основе метода, описанного для антитриптической активности. Для стандартизации полученных результатов их пересчитывали на уровень общего белка цервикагинальных секретов. Белок определяли методом Лоури.

Статистический анализ результатов проводили методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента [3].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что изменение показателей неспецифических протеиназ и их ингибиторов зависят как от уровня бактериальной обсемененности, так и от степени лейкоцитарной инфильтрации. Установлено, что рост микробной обсемененности в цервикагинальных смывах сопровождался прогрессивным ростом активности протеиназ (табл. 1)

Таблица 1

**Состояние неспецифической протеиназ-ингибиторной системы цервику-вагинальных смывов у женщин с различной степенью микробной обсемененности вагинального отделяемого**

Группа	ЭПА (нМ/мг·мин)	ТПА (мкмоль/мг·мин)	АТА (мИЕ/мг)	КСИ (мИЕ/мг)П
Нормальный уровень микрофлоры n=14	4,73±0,5	53,1±8,2	79,4±10,6	48,5,2±7,4
Средний уровень микрофлоры n=15	6,82±0,65 p<0,05	74,6±12,5	85,9±9,8	50,2±18,4
Высокий уровень микрофлоры n=11	17,32±0,91 p<0,001	87,5±11,1 p<0,05	50,3±14,9 p<0,05	28,3±6,7 p<0,05

Примечание: показана достоверность различий по отношению к группе с нормальным уровнем микрофлоры.



Таблица 3

Состояние неспецифической протеиназ-ингибиторной системы цервикагинальных смывов у женщин с различной характеристикой биоценоза влагалища

Группа	Общий белок (г/л)	ЭПА (нМ/мг·мин)	ТПА (мкмоль/мг·мин)	АТА (МИЕ/мг)	КСИ (МИЕ/мг)
нормоценоз (n=11)	0,31±0,03	4,61±0,62	53,3±7,6	78,4±10,2	48,6±5,7
промежуточный тип биоценоза (n=16)	1,13±0,23 p<0,01	5,27±0,39	58,5±6,2	109,6±4,9 p<0,05	58,3±7,2
вагиниты (n=13)	2,35±0,41 p<0,001	14,04±1,08 p<0,001	81,1±8,0 p<0,01	72,8±4,1	35,09±4,62 p<0,05

İdeia=aiéa: iêaçaia aînoiaâdiînoü daçèè÷éé îî îoiîoaièp ê äðoîâ ñ îîdiîoaiçîî.

Состояние ингибиторного потенциала в исследованной биологической жидкости характеризовалось противоположной динамикой изменений. Исследование антитриптической активности показало, что способность связывать трипсин была достоверно выше на 39,8% (p<0,05) в группе с промежуточным типом биоценоза, а в группе с вагинитами отмечалось падение уровня АТА до значений группы с нормоценозом. При изучении показателей активности кислотостабильных ингибиторов протеиназ зарегистрировано незначительное повышение уровня КСИ в группе с промежуточным типом биоценоза, с последующим падением изучаемого показателя в группе с вагинитами на 27,8% (p<0,05) по отношению к нормоценозу. Характерно, что минимальный уровень кислотостабильных ингибиторов соответствовал наиболее выраженному нарушению микробиоценоза влагалища, т.е. вагинитам.

При сравнении различных типов биоценоза влагалища указанные изменения в протеиназ-ингибиторной системе сопровождаются ростом уровня белка при переходе от нормоценоза к вагинитам. Так, в группе с промежуточным типом биоценоза влагалища и в группе с вагинитами показатели белка достоверно повысились, превышая показатели, зарегистрированные в группе с нормоценозом в 3,5 раза (p<0,001) и в 7,5 раз (p<0,001) соответственно. Это может свидетельствовать о том, что реальный деструктивный потенциал протеиназ выражен еще более существенно, чем его характеристика по оценке удельной активности на количество белка цервикагинальных смывов.

Таким образом, полученные в ходе исследования данные свидетельствуют, что при нарушениях биоценоза влагалища отмечается изменения баланса протеиназ-ингибиторной системы. Наиболее су-

щественными закономерностями этих изменений следует признать активацию протеолитических ферментов с преимущественным ростом эластазоподобных протеиназ и параллельное снижение показателей ингибиторов. Это может свидетельствовать о массивном высвобождении протеолитических ферментов из лейкоцитов и поврежденных тканей и приводить к быстрому расходу и истощению ингибиторов протеиназ, а формирование дисбаланса в протеиназ-ингибиторной системе цервикагинального секрета может рассматриваться в качестве важного патогенетического звена в развитии патологических процессов женской репродуктивной системы. В частности, указывается на возможное участие подобных изменений в формировании гиперплазий эндометрия [5]. По-видимому, определение увеличения протеолитической активности лейкоцитарной эластазы и снижения уровня ингибиторов цервикагинальных смывов может служить прогностическим фактором оценки тяжести развития патологических процессов и использоваться в качестве дополнительной информации для диагностики острых и хронических заболеваний женской репродуктивной системы.

#### ВЫВОДЫ

1. При нарушении биоценоза влагалища в цервикагинальном секрете женщин формируется дисбаланс в состоянии неспецифических протеиназ и их ингибиторов, который проявляется увеличением активности трипсино- и эластазоподобных протеиназ, повышением уровня белка и снижением уровня ингибиторов протеаз.

2. Развивающийся дисбаланс наиболее выражен при формировании вагинита и степень его выраженности зависит от уровня лейкоцитарной инфильтрации и бактериальной обсемененности цервикагинального секрета.

3. Определение уровня повышения активности протеиназ и снижения активности ингибиторов в цервикагинальном секрете может быть рекомендовано для оценки степени выраженности воспалительного процесса и анализа эффективности проводимого лечения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Адамян Л.В. Система протеолиза в генезе аденомиоза / Гаврилова Т.В., Степанян А.А. и соавт. // Акушерство и гинекология. - 2005. - №5. - С.22-25.
2. Анкирская А. С. Видовой состав и некоторые биологические свойства лактобацилл при различных состояниях микроэкологии влагалища // Акушерство и гинекология. -2000. - №3. - С. 26-28.
3. Зайцев В.М., Лифляндский В.Г., Маринкина В.И. Прикладная медицинская статистика. - Санкт-Петербург: Фолиант, - 2003. - 432 с.
4. Кира Е.Ф. Инфекции репродуктивное здоровье (часть 1-3) / Кира Е.Ф. // Журнал акушерства и женских болезней. -1999.-Вып.2.-С.71-78; Вып.3.-С.60-66; Вып. 4.- С.50-53.
5. Коваленко Е.П., Татарчук Т.Ф., Литвинова С.В., Кубышкин А.В. Изменения показателей активности местных неспецифических протеиназ и их ингибиторов при гиперплазиях эндометрия // Здоровье женщины. -2011.-№9(65).-С.118-123.
6. Краснопольский В.И. Влияние инфекций на репродуктивную систему женщин / Краснопольский В.И., Серова О.Ф., Туманова В.А., и др. //Российский вестник акушера-гинеколога. - 2004. - №5. - С.26-30.
7. Кубишкін А.В, Харченко В.З., Семенець П.Ф. та інш. Методи визначення активності неспецифічних протеїназ та їх інгібіторів у сироватці крові і біологічних рідинах // Методичні рекомендації. - Київ. - 2010. - 27 с.
8. Маянский Д.Н., Цырендоржиев Д.Д., Рупакова С.А. Лизосомальные ферменты фагоцитирующих клеток в патогенезе воспаления // Вопросы медицинской химии. - 1987. - №5. - С.48-52.
9. Сидорова И.С., Воробьев А.А., Боровкова Е.И. Микробиоценоз половых путей женщин репродуктивного возраста. // Акушерство и гинекология. - 2005. - №2. - С.7-9.
10. Сметник В.П., Тумилович Л.Г.р Неоперативная хирургия. - Москва. -2002. - 582с.
11. Уварова Е.В., Султанова Ф.Ш. Влагалище как микроэкологическая система в норме и при воспалительных процессах гениталий различной этиологии.// Гинекология. - 2002. - т.№4. - №4. - С. 189-195.
12. Chua F. Neutrophil elastase: mediator of extracellular matrix destruction and accumulation / F. Chua, G.J. Laurent //Proc. Am Thorac Soc. - 2006. - Vol. 3, №5. - P. 424-427.
13. Jayanti Mania-Pramanik, 1 Shobha S. Potdar, 1 Ashok Vadigoppula, 1 and Shankar Sawant2. Elastase: A Predictive Marker of Inflammation and/or Infection. - J. Clin. Lab. Anal. - 2004. - №18. - P.153-158.
14. Kopa Z., Wenzel I., Papp G. K., Haidl G/ Role of granulocyte elastase and interleukin-6 in the diagnosis of male genital tract inflammation//Andrologia. -2005.-vol.3.№2. - p.188-194.
15. Newton E. R. Predictors of the vaginal microflora / , E. R. Newton J. M. Piper et al. // Am. J. Obstet. Gynecol. -2001. - Vol. 84. - № 5. - P. 845-853.
16. Weiss G, Goldsmith L. T., Taylor RN, Bellet D., Taylor HS. Inflammation in reproductive disorders// Reprod Sci. - 2009. -v. 16(2). - p.216-229.